

## 白血球及リンパ腫細胞株における第7染色体の欠失 とマイクロサテライトの不安定性

著者	小寺 隆雄
号	1525
発行年	1999
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/21756">http://hdl.handle.net/10097/21756</a>



# 論文内容要旨

## 研究目的

- (1) 急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群では、その約10%に第7染色体長腕(7q)の欠失が報告されており、この染色体上に白血病の発生に関与する未知の癌抑制遺伝子の存在が示唆されている。本研究の目的は新しい癌抑制遺伝子の染色体上の位置を決定すること、即ち、白血病における7q上の共通欠失領域の正確な位置を求めることである。
- (2) マイクロサテライトの不安定性(MSI)によって検出されるゲノム不安定性はDNAミスマッチ修復酵素遺伝子異常などによって引き起こされ、遺伝性非腺腫症性大腸癌を初めとするさまざまな悪性腫瘍でその発生、進展に関与している。本研究の目的は造血器悪性腫瘍におけるMSIの頻度と特異性を明らかにすることである。

## 研究結果

白血病細胞における7q欠失領域を明らかにするため、57例の白血病及びリンパ腫細胞株(骨髄性白血病33例、リンパ性白血病及びリンパ腫24例)を用いて第7染色体上の29個のマイクロサテライトローカスの遺伝子型を検索した。それぞれのローカスをP<sup>32</sup>で標識してPCRで増幅し、5%アクリルアミドゲルで分離した後、オートラジオグラフィーで検出した。各々の遺伝子型は2本の異なる大きさのPCR産物が検出された場合をヘテロ接合体、1本の場合をホモ接合体と判定した。ホモ接合体の場合、2つの相同染色体由来のPCR産物の大きさが同じ場合と片方の染色体で検索したローカスが欠失している場合(ヘミ欠失)が考えられる。一般人集団で期待されるヘテロ接合体の頻度と腫瘍細胞株での頻度をFisher検定法で比較した。骨髄性白血病細胞株ではいくつかのローカスにおいてヘテロ接合体の頻度が統計的に有意( $P < 0.01$ )に低く、ヘミ欠失が高頻度に起きている可能性が示唆された。個々の細胞株では骨髄性白血病細胞株14株、リンパ系腫瘍細胞株2例において、いくつかの連続するローカスがホモ接合性を示し、その領域はヘミ欠失していると考えられた。骨髄性白血病細胞株14例すべてに共通な領域はなかったが、D7S633からテロメアまでの領域は、1つの細胞株を除いてホモ接合性が連続していた。また7q31の約0.5cMの領域にマップされるD7S2418からD7S687までの領域も、ホモ接合性の連続領域が13例の細胞株で重複していた。しかしこの2つ目の共通領域内には、これ以上利用できるマイクロサテライトローカスがなく、ホモ接合性の連続は確認できなかった。

本研究では同時に57の造血器腫瘍細胞株におけるMSIの検索を行った。29個のマイクロサテライトローカスにおける遺伝子型を検討したところ、24のリンパ系腫瘍細胞株のうち6例にて

20%以上のローカスで梯子状の異常なバンドが検出され、MSIが起きていることが示唆された。もともと MSI は正常組織とは異なる大きさの PCR 産物が腫瘍組織で検出された時に判定されるため、正常組織を持たない細胞株ではこの方法だけでは MSI の存在を確定できない。そこで、BAT-26, BAT-25 を用いた検討をおこなった。BAT-26 ローカスは hMSH2 遺伝子のイントロン 5, BAT-25 ローカスは c-KIT 遺伝子のイントロン 16 に存在し、それぞれ 26, 25 個の poly (A) リピートを含んでいる。MSI のない検体では単一の大きさの PCR 産物が検出されることから、その大きさの異常は MSI を示し、正常組織との比較を要しない。それぞれのローカスでの PCR 産物を検討したところ、6 例中 5 例の細胞株で両方のローカスで異常バンドが検出されたが、一つの細胞株では BAT-25 で異常バンドが検出されなかった。以上より、少なくとも 24 例中 5 例 (20.8%) のリンパ系腫瘍細胞株で MSI が起きていることが分かった。また 33 個の骨髄性白血病細胞株では MSI は全く認められなかった。

## 考 察

(1) D7S2418 から D7S687 までの 7q31 上約 0.5 センチモルガンの領域と D7S633 からテロメアまでの領域に骨髄性白血病細胞株での共通欠失領域がある可能性が統計学的に示された。本研究はクローナルな検体を用いて白血病での第 7 染色体長腕共通欠失領域を検索した世界で最初の研究である。実際に欠失があることを FISH により確認したり、さらに領域を狭める必要はあるが、新しい癌抑制遺伝子の存在部位を予想できたことは、その遺伝子を単離するための貴重な情報であると考えている。

(2) 本研究ではリンパ系腫瘍の一群で MSI が関与していることを明らかにした。これまでは造血器悪性腫瘍とゲノム不安定性との関係は議論が分かれていた。今後 MSI のある造血器悪性腫瘍とその臨床病態を検討し、造血器悪性腫瘍の新しい発生機構を明らかにするとともに、その結果が予後の判定や治療等、臨床に応用されることが期待される。

## 審 査 結 果 の 要 旨

急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群では、約 10%に第 7 染色体長腕 (7q) の欠失が報告され、この染色体上に白血病化に関与する未知の癌抑制遺伝子の存在が示唆されている。近年、非常に多型性に富むマイクロサテライトマーカーが染色体上に密に配置され、詳細な染色体の欠失地図の作成が可能になった。また多型性が非常に高いマーカーにより統計学的解析を使って細胞株の染色体欠失領域を推定することも可能になっている。これらにより固形癌では染色体の欠失と癌抑制遺伝子との関わりが詳細に検討されているが、白血病では腫瘍細胞に正常細胞が混入しやすい、患者から正常組織が得られにくい等の問題もあり研究が遅れている。これまでの核型解析、FISH 解析、マイクロサテライトマーカーを用いた解析では、白血病における 7q 上の共通欠失領域は 7q22-31 と 7q32-34 に報告されているが、正確な位置は決まっていない。

マイクロサテライトの不安定性 (MSI) により検出される遺伝子の不安定性は、遺伝性非腺腫症性大腸癌を初め種々の悪性腫瘍の発生や進展に関与しているが、造血器悪性腫瘍に関しては意見が分かれている。これは腫瘍組織を正常組織と比較する従来の MSI の判定方法に明確な基準がなかったためと考えられる。しかし近年、BAT-26, BAT-25 マーカーの出現により、正常組織との比較を要せずに MSI の高精度な判定が可能になってきている。

本研究では白血病における 7q 上の欠失領域の正確な位置を求めるため、また造血器悪性腫瘍での MSI の頻度と特異性を調べるために、マイクロサテライトマーカーと BAT-26, BAT-25 マーカーの特徴をいち早く白血病の解析に応用し、また細胞株を用い正常細胞が腫瘍細胞へ混入することを防いでいる。求められる領域は間接的なものではあるが、患者検体を用いた研究報告と比較しても遜色のない結果が期待できる。

本研究で同定された 2 つの共通領域は白血病だけでなく腎癌、卵巣癌等の種々の固形癌での研究報告とも部分的に重複しており、白血病を初め固形癌の発生や進展に関わる共通の癌抑制遺伝子がこの領域に存在する可能性が示唆された。実際に欠失が起きていることを FISH 解析などで確認する必要性や、さらに範囲を狭める必要はあるが、新しい癌抑制遺伝子を単離するための貴重な情報であると考えられる。

またリンパ系腫瘍の一群で MSI が関与していることが明らかにされた。これはリンパ系悪性腫瘍の発生に遺伝子の不安定性が関与している可能性を示唆しており、リンパ系悪性腫瘍の新しい発生機序を示すものである。今後 MSI のある造血器悪性腫瘍とその臨床病態を検討し、造血器悪性腫瘍の新しい発生機構を明らかにするとともに、その結果が予後の判定や治療等、臨床に応用されることが期待される。